

The role of red blood cells in adaptation to exercise of patients with atherosclerotic ischemia of lower limbs

Udział układu czerwonokrwinkowego w adaptacji chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych do wysiłku fizycznego

Włodzimierz Drożdż¹, Władysław Lejman¹, Mariusz Wilczek¹, Kinga Gajdzińska²

¹II Chair of Surgery of Medical College of Jagiellonian University, Cracow, Poland (Katedra Chirurgii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie)

²Students' Scientific Society (Studenckie Towarzystwo Naukowe)

Abstract

Background. The effects of treatment conducted on patients suffering from atherosclerosis and ischemia of lower limbs on red cells: elasticity, erythropoiesis, oxygen dissociability from hemoglobin, and antioxidative potential was investigated

Material and methods. Sixty three patients with mean claudication distance of 400 m and AB/1 0.70 undergoing conservative treatment (12 weeks of controlled treadmill training and pentoxifylline administration), and forty four patients with critical leg ischemia mean claudication distance below 50 m or rest pain, AB/1 0.30 who underwent surgical revascularisation (bypass grafts) were included in the present study. The controls consisted of 22 age-matched patients without signs of leg ischemia.

Blood samples for evaluation of red cell deformability, concentration of diphosphoglyceric acid (2,3-DPG), reticulocyte count and red cell antioxidant status: concentration of reduced glutathion (GSH), and superoxide dismutase (SOD) [EC-1.15.1.1] were collected at entry, after 6 weeks and after 12 weeks from initiation of the treatment or after operation. The changes in clinical status were expressed by claudication appearing time (CAT), maximal walking time (MWT) and ankle/brachial index (ABI) values.

Results. In both groups of patients, after 12 weeks there were signs of significant clinical symptomatic improvement expressed as prolongation of CAT and MWT. In the group subjected to conservative treatment, after 12 weeks there was a significant increase of red cell deformability, enhanced erythroncytosis, oxygen dissociation from haemoglobin (increased 2,3-DPG concentration), and increased red cell antioxidant potential measured by the GSH and SOD concentrations.

Conversely, in the group subjected to successful surgical revascularisation, in spite of significant clinical improvement 12 weeks after operation, both the low red cell deformability and antioxidant potential were not normalized.

Conclusions. In the case of patients with moderate atheromatous leg ischemia subjected to conservative treatment, red cells play an active part in the development of adaptive mechanisms to physical effort. This effect was not observed in the group of patients with critical leg ischemia after revascularisation

Key words: atherosclerosis, ischemia of the legs, red cells, deformability, antioxidant potential

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr hab. med. Włodzimierz Drożdż, II Katedra Chirurgii CMUJ
ul. Kopernika 21, 31–501 Kraków
e-mail: msdrozd@cyf-kr.edu.pl

Streszczenie

Wstęp. U chorych z różnym stopniem zaawansowania miażdżycy i niedokrwienia kończyn dolnych badano wpływ leczenia na: elastyczność, erytropoezę, dysocjację tlenu z hemoglobiny oraz potencjał antyoksydacyjny krwinek czerwonych.

Materiał i metody. Do badań włączono 63 chorych ze średnim dystansem chromania przestankowego 400 m i wskaźnikiem kostkowo-ramiennym wynoszącym 0,70, których poddano leczeniu zachowawczemu (12-tygodniowy okres ćwiczeń marszowych na bieżni ruchomej, oraz terapia pentoksyfilliną w dawce 400 mg 3 x dz.) i 44 pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych i średnim dystansem chromania < 50 m oraz wskaźnikiem kostkowo-ramiennym 0,30, u których wykonano przeszczepy omijające. Grupę kontrolną stanowiło 22 osób w podobnym wieku bez objawów niedokrwienia kończyn.

Wyniki. W obu grupach po 12 tygodniach obserwowano wyraźną poprawę kliniczną, której wyrazem było wydłużenie czasu pojawienia się chromania (CAT) i maksymalnego czasu marszu (MWT). W grupie leczonej zachowawczo stwierdzono: wzrost elastyczności krwinek czerwonych, nasilenie erytropoezy oraz dysocjacji tlenu z hemoglobiny (wzrost stężenia 2,3-DPG). Zwiększył się również ich potencjał antyoksydacyjny (wzrost stężenia GSH i SOD). W grupie chorych operowanych nawet po skutecznej rewaskularyzacji utrzymywały się sztywność krwinek czerwonych i niski potencjał antyoksydacyjny.

Wnioski. W grupie chorych z umiarkowaną miażdżycą i niedokrwieniem kończyn dolnych (dystans chromania 400 m) po leczeniu zachowawczym stwierdzono udział krwinek czerwonych w adaptacji ustroju do wysiłku fizycznego. Zjawiska tego nie stwierdzono u pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn po rewaskularyzacji.

Słowa kluczowe: miażdżycy, niedokrwienie kończyn, elastyczność, potencjał antyoksydacyjny krwinek czerwonych

Introduction

Recent studies have considerably improved our knowledge of the unfavourable role played by rheological changes in hemodynamics of the tissue blood flow observed in patients with atherosclerotic ischemia of lower limbs. They include: high hematocrit value, high concentration of fibrinogen, increased viscosity of whole blood and plasma and reduced elastic deformability of erythrocytes and leucocytes. In pathomechanism of atherosclerotic ischemia, the higher the drop in perfusion pressure, the more prominent the effect of these factors on flow disturbances, especially in the area so important for metabolism — microvascular circulation.

In patients with intermittent claudication, everyday life activities result in recurrent episodes of ischemia-reperfusion in the area of lower limbs. A factor playing quite a unique role in damage of the tissues, which may happen mainly during reperfusion, is oxygen itself. In this case, the reactive forms of oxygen, also known as free radicals, are formed in excess, and the state is called oxidative stress. The potential threat to the structure and functioning of cells results in the development of defensive mechanisms, which cause neutralisation of the radicals, causing them to enter into reactions with antioxidants [1–3].

In the functioning of the widely understood adaptation-defensive mechanisms, a particular role falls to the

Wstęp

Dzięki badaniom przeprowadzonym w ostatnich latach poszerzył się zasób wiedzy na temat niekorzystnej roli, jaką odgrywają w hemodynamice przepływu tkankowego zmiany reologiczne, występujące u chorych w przebiegu miażdżycowego niedokrwienia kończyn dolnych. Należą do nich: podwyższone wartości hematokrytu, wysokie stężenia fibrynogenu, wzrost lepkości pełnej krwi i osocza oraz zmniejszona elastyczność — odkształcalność krwinek czerwonych i białych. W patomechanizmie miażdżycowego niedokrwienia wraz ze zwiększeniem spadku ciśnienia perfuzyjnego udział tych czynników w zaburzeniu przepływu zwłaszcza w metabolicznie ważnym obszarze, jakim jest mikrokążenie, odgrywa coraz większą rolę.

U ludzi z chromaniem przestankowym codzienna aktywność życiowa wiąże się z powtarzającymi się epizodami niedokrwienia-reperfuzji w obrębie kończyn dolnych. Czynnikiem odgrywającym szczególną rolę w uszkodzeniu tkanek, do którego może dochodzić głównie w czasie reperfuzji, jest sam tlen. Powstają wtedy w nadmiarze reaktywne formy tlenu (tzw. wolne rodniki tlenowe). Stan ten określa się mianem „stresu oksydacyjnego”. Związane z tym zagrożenie dla struktury i funkcji komórki doprowadziło do wykształcenia mechanizmów obronnych, dzięki którym powstające rodniki są neutralizowane, wchodząc w reakcje z antyoksydantami [1–3].

erythrocytes. In states of reduced perfusion pressure, their deformability considerably affects blood circulation in the microvascular system, while the availability of oxygen at the level of cells depends, among other things, on its regular dissociation from haemoglobin. Owing to their high exposure to places where free oxygen radicals are formed, the erythrocytes also play an important defensive role in the states of oxidative stress. It is assumed that changes in their antioxidative potential correspond to systemic changes [4, 5].

The aim of this study is the investigation of the effects of treatment conducted on patients suffering from atherosclerosis and ischemia of lower limbs at various stages of advancement on the deformability, erythropoiesis, oxygen dissociability from haemoglobin, and antioxidative potential of erythrocytes.

Material and methods

Studies covered patients directed to the Outpatient Clinic of Peripheral Vessels Disease, II Department of Surgery, Collegium Medicum and Jagellonian University in Cracow with diagnosis of atherosclerotic ischemia of lower limbs.

During preliminary examination, the presence or lack of blood flow signals in the dorsal artery and in posterior tibial artery were measured using a Doppler Blood Flow Detector made by MedaSonic, and the value of ankle/brachial index (ABI) whilst walking on a treadmill at a controlled speed of 3 km/hour at an elevation of 10 degrees was calculated. The following parameters were measured: intermittent claudication distance (ICD) in metres, claudication appearing time (CAT) in minutes, and maximal walking time (MWT) in minutes; i.e. the time that must elapse until the patient has to cease walking on a track because of pain intensification.

Observations were carried out on 107 patients with symptoms of chronic ischemia of lower limbs; of this number, 63 patients with medium distance of claudication amounting to 400 m and ABI value of 0.70 were directed for medical treatment, and 44 patients with critical ischemia of lower limbs or rest pains (medium distance of claudication amounting to less than 50 m and ABI value of 0.30) were subjected to operative revascularization.

A control group was formed of 22 patients of comparable age without symptoms of ischemia in lower limbs who were admitted for elective surgery (laparocholecystectomy or hernia repair operations).

During conservative treatment, the patients received a haemorheological drug (pentoxifylline in a dose of 400 mg 3 times a day) and took part in a programme of walking kinesitherapy. The walking exercises were car-

W działaniu szeroko pojętych mechanizmów adaptacyjno-obronnych szczególne znaczenie mają krwinki czerwone. W stanach obniżonego ciśnienia perfuzyjnego stopień ich elastyczności w znacznym stopniu wpływa na przepływ w mikrokrążeniu, zaś dostępność tlenu na poziomie komórek jest uzależniona między innymi od prawidłowej jego dysocjacji z hemoglobiny. Krwinki czerwone ze względu na szeroką ekspozycję w miejscach powstawania wolnych rodników tlenowych odgrywają także ważną rolę obronną w stanach stresu oksydacyjnego. Przyjmuje się, że zmiany ich potencjału antyoksydacyjnego odpowiadają zmianom ogólnoustrojowym [4, 5].

Celem pracy było zbadanie wpływu leczenia chorych w różnych stadiach zaawansowania miażdżycy i niedokrwienia kończyn dolnych na: elastyczność, erytropoezę, zdolność dysocjacji tlenu z hemoglobiny oraz potencjał antyoksydacyjny krwinek czerwonych.

Materiał i metody

Badaniami objęto chorych kierowanych do Przychodni Schorzeń Naczyń Obwodowych II Katedry Chirurgii CMUJ w Krakowie, z rozpoznaniem miażdżycowego niedokrwienia kończyn dolnych.

W czasie badania wstępnego rejestrowano obecność lub brak sygnału przepływu w tętnicach: grzbietowej stopy i piszczelowej tylnej (Doppler blood flow detector f-my MedaSonic) oraz wyliczano wartość wskaźnika kostkowo-ramiennego (ABI) w marszu na bieżni z kontrolowaną prędkością (3 km/h przy wzniesieniu 10 stopni). Mierzono także: dystans chromania przestankowego (ICD) w metrach, czas pojawienia się chromania (CAT) w minutach oraz maksymalny czas marszu (MWT) w minutach — był to okres, po upływie którego chory przestawał chodzić na bieżni ze względu na nasilenie dolegliwości bólowych.

Obserwacją objęto 107 chorych z objawami przewlekłego niedokrwienia kończyn dolnych — 63 z nich ze średnim dystansem chromania 400 m i wartością ABI równą 0,70 zakwalifikowano do leczenia zachowawczego, zaś 44 chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn lub bólami spoczynkowymi (średni dystans chromania poniżej 50 m, ABI = 0,30) poddano rewaskularyzacji.

Grupę kontrolną stanowiło 22 chorych w porównywalnej grupie wiekowej bez objawów niedokrwienia kończyn dolnych zakwalifikowanych do planowych zabiegów operacyjnych (laparoskopowej cholecystektomii lub operacji przepuklin).

W czasie leczenia zachowawczego chorzy otrzymywali lek hemoreologiczny (pentoksifylinę w dawce 400 mg 3 x dz.) oraz brali udział w programie kinezyterapii marszowej. Ćwiczenia marszowe odbywali po

ried out by the patients after preliminary instructions and practical training using a moving track with a belt feed rate of 3 km/hour. Every single exercise consisted of three walking units (each corresponding to 80% of the maximal walking time on a track calculated for every patient individually). During a period of 12 weeks, the patients did these walking exercises three times a week, supervised by a nurse and a doctor.

Patients admitted for surgical treatment were subjected to bypass graft operations.

The following parameters were measured under the initial conditions, after the lapse of 6 weeks, and after 12 weeks of observation: CAT, MWT, ABI values, erythrocytes deformability, reticulocytes number, concentration of diphosphoglyceric acid (2,3-DPG) and of reduced glutathione (GSH), and superoxide dismutase (SOD) [EC-I.15.1.1].

The erythrocytes deformability was measured on a Myrenne GmbH diffractometer (Laser Shear Stress Diffractometer Rheodyn SSD), which enabled examination of the erythrocyte elastic behaviour over a wide range of the shear stress values, i.e. from 0.30 to 60 Pa. The determination of diphosphoglyceric acid (2,3-DPG) was made according to the method proposed by Rose and Liebowitz, using a set of reagents made by SIGMA Diagnostic [6]. The activity of superoxide dismutase (SOD) [EC-I.15.1.1] was determined by the Marklund & Marklund technique, developed in 1974 and modified by Beutler in 1984 [7]. The level of reduced glutathione (GSH) was measured through absorbance readout (A) with wavelength of 412 nm [8].

Next, the mean and standard deviation values of the measured parameters were calculated. The statistical significance of variations observed in the mean values was verified by Student-t test at a level of significance $p < 0.05$.

The above studies were conducted by permission of the Commission of Bioethics. Patients' consent was also obtained immediately before the studies began.

Results

In both groups of patients, i.e. these who received conservative treatment as well as those who were subjected to revascularisation, after 12 weeks some obvious symptoms of clinical improvement were observed, manifested by a significant prolongation of the claudication appearing time (CAT) and maximal walking time (MWT). In the group of patients who were administered a conservative treatment, the time increased from the starting value of 2.80 ± 0.30 minutes to 7.30 ± 0.90 minutes after 12 weeks (an increase of 160%), while the MWT increased from 4.90 ± 0.40 minutes to

wstępnym instruktażu i praktyce, na bieżni ruchomej, przy prędkości przesuwu taśmy wynoszącej 3 km/h. Jedno ćwiczenie składało się z trzech jednostek marszowych (każda odpowiadała 80% maksymalnego czasu marszu na bieżni wyliczonego dla poszczególnego pacjenta). Chorzy przez 12 tygodni odbywali trzy razy w tygodniu takie ćwiczenia marszowe pod nadzorem pielęgniarki i lekarza.

U chorych zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego wykonywano przeszczepy omijające niedrożne odcinki tętnic.

W warunkach wyjściowych oraz po 6 tygodniach i 12 tygodniach obserwacji mierzono następujące parametry: CAT, MWT, ABI, elastyczność erytrocytów, liczbę retikulocytów, stężenie kwasu difosfoglicerynowego (2,3-DIG), zredukowanego glutationu (GSH), oraz dysmutazy nadtlencowej — SOD [EC-I.15.1.1].

Odształcalność krwinek czerwonych mierzono za pomocą dyfraktometru firmy Myrenne GmbH (Laser shear Stress Diffractometer Rheodyn SSD), który umożliwiał badanie elastyczności krwinek w szerokim zakresie naprężeń stycznych (*shear stress*) — 0,30–60 Pa. Oznaczanie 2,3-DPG wykonywano według metody podanej przez Rose i Liebowitza — używając zestawu odczynników firmy SIGMA Diagnostic [6]. Aktywność dysmutazy nadtlencowej oznaczano według metody Marklund & Marklund (1974), zmodyfikowanej przez Beutlera w 1984 roku [7]. Oznaczenia zredukowanego glutationu wykonywano, odczytując absorbancję (A) przy długości fali 412 nm [8].

Obliczano średnie i odchylenia standardowe mierzonych parametrów. Istotność statystyczną obserwowanych różnic wartości średnich weryfikowano za pomocą testu *t*-Studenta (przy poziomie istotności $p < 0,05$).

Na przeprowadzenie powyższych badań otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej, a przed rozpoczęciem obserwacji uzyskiwano ją dodatkowo również od chorych.

Wyniki

Zarówno w grupie chorych leczonych zachowawczo, jak i u osób po zabiegu rewaskularyzacji po 12 tygodniach obserwowano wyraźne objawy poprawy klinicznej, czego wyrazem było znaczne wydłużenie czasu pojawienia się chromania oraz maksymalnego czasu marszu.

W grupie zachowawczej CAT z wyjściowego $2,80 \pm \pm 0,30$ min zwiększył się po 12 tygodniach do $7,30 \pm \pm 0,90$ min (wzrost o 160%), a MWT z $4,90 \pm 0,40$ min do $11,80 \pm 1,70$ min (wzrost o 140%). W grupie tej w okresie obserwacji nie występowały statystycznie znaczne zmiany wartości ciśnienia skurczowego mierzonego w tętnicach obwodowych oraz wartości ABI.

Table I. Mean initial values of red blood cells elongation (%) (blood viscosity 24 mPa/sec) in the groups: control (n = 22) conservative (n = 63), revascularisation (n = 44)**Tabela I.** Średnie wartości wyjściowe odkształcalności (%) krwinek czerwonych (lepkość krwi 24 mPa/s) w grupach: kontrolnej (n = 22), leczonej zachowawczo (n = 63) i poddanej operacji (n = 44)

Shear stress values [Pa] Wartości naprężenia stycznego	Control group Grupa kontrolna	Conservative group Grupa leczona zachowawczo	Revascularisation Grupa poddana rewaskularyzacji
0.30	6.77	2.31	0.81
0.60	9.83	3.68	1.10
1.20	24.31	9.90	1.90
3.00	37.06	11.63	5.60
6.00	41.50	29.62	7.93
12.00	51.96	33.80	15.63
30.00	55.76	39.66	19.78
60.00	74.66	48.75	23.75

11.80 ± 1.70 minutes (an increase of 140%). In this group, during observations, no statistically significant changes were recorded in the value of systolic pressure measured in peripheral arteries and in the value of ABI.

In a similar manner, in the group after revascularisation, CAT from the starting value of 1.40 ± 0.50 minutes increased after 12 weeks to a level of over 10 minutes, while the value of MWT increased from the starting level of 3.70 ± 1.10 minutes up to a level of over 15 minutes. In this group, after 12 weeks, a statistically significant increase in the value of systolic pressure measured in peripheral arteries from the value of 38 ± 14 mm Hg up to a value of 101.0 ± 27 mm Hg and ABI values from 0.30 ± 0.04 up to 0.94 ± 0.07 were recorded.

The mean starting values of erythrocyte deformability (%) in the control group (n = 22) who received conservative treatment (n = 63) and in those who were subjected to revascularisation (n = 44) are compared in Table I. Our observations confirm the opinions of other researchers that in the case of patients with atherosclerosis of peripheral arteries, the erythrocytes lose their elasticity. Within all ranges of the examined values of shear stress, the greatest deformability was recorded just in the control group. In the case of patients with atherosclerosis, the elasticity of erythrocytes suffered a significant decrease. The lowest values were observed in patients with advanced atherosclerosis and ischemia of lower limbs.

The effect of medical treatment on changes in erythrocyte deformability is shown in Table II. In the group with mildly advanced atherosclerosis and ischemia, where patients were subjected to medical treatment (a haemorheological drug and walking kinesitherapy), after 12 weeks of treatment, a significant increase in

Podobnie w grupie po rewaskularyzacji CAT z wyjściowego 1,40 ± 0,50 min zwiększyło się po 12 tygodniach powyżej 10 min, zaś MWT z wyjściowego 3,70 ± 1,10 min do powyżej 15 min. W grupie tej po 12 tygodniach stwierdzano statystycznie znamienny wzrost wartości ciśnienia skurczowego mierzonego w tętnicach obwodowych z 38 ± 14 mm Hg do 101,0 ± 27 mm Hg, oraz wskaźnika ABI z 0,30 ± 0,04 do 0,94 ± 0,07.

Średnie wartości wyjściowe odkształcalności krwinek czerwonych w grupach: kontrolnej (n = 22), leczonej zachowawczo (n = 63) i poddanej rewaskularyzacji (n = 44) przedstawiono w tabeli I. Obserwacje zawarte w niniejszej pracy potwierdzają doniesienia innych autorów — u chorych z miażdżycą tętnic obwodowych występuje usztywnienie krwinek czerwonych. We wszystkich zakresach badanych wartości naprężenia stycznego największą odkształcalność stwierdzano w grupie kontrolnej. U chorych z miażdżycą elastyczność krwinek ulegała znamiennej zmniejszeniu. Najniższe jej wartości obserwowano u pacjentów z zaawansowaną miażdżycą i niedokrwieniem kończyn dolnych.

Wpływ leczenia na zmiany elastyczności krwinek czerwonych przedstawiono w tabeli II. W grupie ze średnio zaawansowaną miażdżycą i niedokrwieniem, którą poddano leczeniu zachowawczemu (lek hemo-reologiczny oraz kinezyterapia marszowa), po 12-tygodniowej terapii zanotowano znamienny wzrost elastyczności krwinek we wszystkich zakresach ciśnienia stycznego.

Skuteczna rewaskularyzacja nie powodowała zwiększenia elastyczności krwinek czerwonych. W 12. tygodniu po operacji elastyczność krwinek nie różniła się istotnie w porównaniu z wartościami wyjściowymi (tab. II).

Badając wpływ prowadzonego leczenia na stymulację erytropoezy wyrażoną pojawieniem się w krwi ob-

Table II. Mean values of red blood cells elongation (%) (blood viscosity 24 mPa/sec), initial, after 6 weeks, and after 12 weeks of observation in the groups: conservative (n = 63), revascularisation (n = 44)**Tabela II.** Średnie wartości odkształcalności krwinek czerwonych (lepkość krwi 24 mPa/s) w grupach: leczonej zachowawczo i poddanej rewaskularyzacji; wyjściowo, po 6 i po 12 tygodniach

Shear stress values [Pa] Wartości naprężenia stycznego	Initial values Wyjściowo		After 6 weeks Po 6 tygodniach		After 12 weeks Po 12 tygodniach	
	C	R	C	R	C	R
0.30	2.31	0.81	2.81	1.21	6.63	1.01
0.60	3.68	1.10	7.43	1.46	8.87	1.51
1.20	9.90	1.90	15.61	2.98	15.71	2.30
3.00	11.63	5.60	20.18	4.63	22.68	4.75
6.00	29.64	7.93	31.19	6.74	29.16	8.30
12.00	33.80	15.69	39.00	17.58	39.81	18.70
30.00	39.66	19.78	46.00	21.56	50.61	20.73
60.00	48.75	23.75	61.73	33.76	68.78	25.51

C — conservatively treated group (grupa leczona zachowawczo); R — revascularisation (grupa poddana rewaskularyzacji)

erythrocyte elasticity was noted to take place within all ranges of systolic pressure. The conducted effective revascularisation did not cause an increase in erythrocyte elasticity. In week 12 after the surgical treatment, the elasticity of erythrocytes did not show any major changes compared to the starting values (Table II).

In examinations of the effect of the conducted treatment on the stimulation of erythropoiesis manifested by the appearance of some young forms of erythrocytes in the peripheral blood, the number of reticulocytes per 1000 of mature red blood cells was calculated.

The observed changes are shown in Table III and in Figure 1. It was noted that walking exercise caused an increase in the number of reticulocytes in the group subjected to conservative treatment. In week 12 of observation, it had all the features of statistical significance ($p < 0.05$). The starting number of reticulo-

wodowej młodych form krwinek obliczano liczbę retikulocytów na 1000 dojrzałych krwinek czerwonych.

Obserwowane zmiany przedstawiono w tabeli III i na rycinie 1. Stwierdzono, że wysiłek fizyczny związany z ćwiczeniami marszowymi powoduje w grupie leczonej zachowawczo wzrost liczby retikulocytów (w 12. tygodniu obserwacji miał on cechy znamienności statystycznej — $p < 0.05$). Wyjściowa liczba retikulocytów w grupie poddanej operacji była najwyższa. W okresie pooperacyjnym liczba retikulocytów zmniejszała się, zbliżając się do wartości występującej w grupie kontrolnej (tab. III, ryc. 1).

Zdolność hemoglobiny do dysocjacji tlenu określano, mierząc stężenie 2,3-DPG w krwinkach czerwonych. Zmiany stężeń przedstawiono w tabeli IV i na rycinie II. Najniższe wyjściowe stężenie 2,3-DPG stwierdzano u osób operowanych, jednak w obu grupach było ono znamienne niższe w porównaniu z grupą kontrolną

Table III. Number of reticulocytes (per 1000 red cells) in the groups: control (n=22), conservative (n = 63), revascularisation (n = 44). Mean values and standard deviations**Tabela III.** Liczba retikulocytów (na 100 krwinek czerwonych) w grupach: kontrolnej (n=22), zachowawczej (n = 63) i poddanej rewaskularyzacji (n = 44). Wartości średnie, odchylenie standardowe

	Initial values Wartości wyjściowe	After 6weeks Po 6 tygodniach	After 12 weeks Po 12 tygodniach
Control group Grupa kontrolna	0.006 ± 0.002+	—	—
Conservative group Grupa leczona zachowawczo	0.007 ± 0.004	0.010 ± 0.002	0.013 ± 0.003*
Revascularisation group Grupa poddana operacji	0.009 ± 0.003+	0.008 ± 0.004	0.007 ± 0.002

+ — statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with the initial values of the controls (różnica znamienna $p < 0.05$ vs. wartości wyjściowe w grupie kontrolnej); * — statistically significant difference ($p < 0.01$) compared with the initial values within the same group (różnica znamienna $p < 0.01$ vs. wartości wyjściowe w obrębie tej samej grupy)

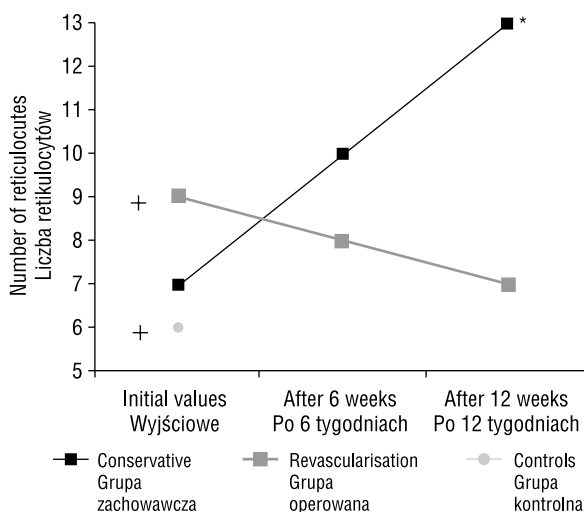


Figure I. Changes of the reticulocytes number (per 1000 red cells) in groups: control (n = 22), conservative (n = 63) and revascularisation (n = 44); mean values

Rycina I. Zmiany liczby retikulocytów (na 1000 krwinek czerwonych) w grupach: kontrolnej (n = 22), leczonej zachowawczo (n = 63) i poddanej operacji (n = 44); wartości średnie, + różnica statystycznie znamienne (p < 0,05) vs. wartości w grupie kontrolnej, *różnica statystycznie znamienne (p < 0,05) vs. wartości wyjściowe w tej samej grupie

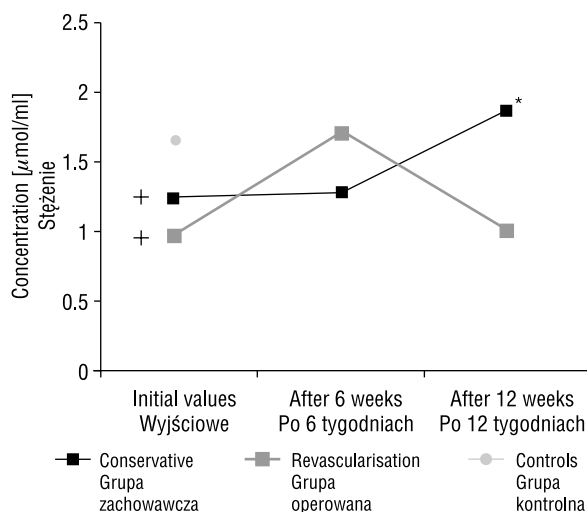


Figure II. 2,3-diphosphoglyceric acid (umol/ml) concentration changes of the red blood cells, in the groups: control (n = 22), conservative (n = 63) and revascularisation (n = 44); mean values

Rycina II. Zmiany stężenia 2,3-difosfoglicerynianu krwinek czerwonych w grupach: kontrolnej (n = 22), leczonej zachowawczo (n = 63) i poddanej operacji (n = 44); wartości średnie i odchylenia standardowe, + różnica statystycznie znamienne (p < 0,05) vs. wartości w grupie kontrolnej, *różnica statystycznie znamienne (p < 0,05) vs. wartości wyjściowe w tej samej grupie

cytes in the group of patients after surgical treatment was the highest. During the post-operative period, the number of reticulocytes decreased, until approaching the value observed in the control group (Table III, Figure I).

To determine the haemoglobin susceptibility to oxygen dissociation, the concentration in erythrocytes of 2,3-diphosphoglyceric acid (DPG) was measured. The changes in the recorded concentrations are shown in Table IV and in Figure II. The lowest starting concentration of 2,3-DPG was observed in the group of patients

(p < 0,05). Po 12 tygodniach leczenia zachowawczego nastąpił znamieny wzrost stężenia 2,3-DPG (p < 0,05), zaś w grupie chorych poddanych operacji po przejściowym jego wzroście w 6. tygodniu stężenie 2,3-DPG obniżyło się, przyjmując w 12 tygodniu obserwacji wartości zbliżone do wyjściowych.

Stan potencjału antyoksydacyjnego krwinek czerwonych oceniano na podstawie pomiaru stężenia zredukowanego glutationu oraz stężenia dysmutazy ponadtlenkowej. Zmiany stężenia GSH przedstawiono w tabeli V i na rycinie III. W obu leczonych grupach wyjścio-

Table IV. 2,3-diphosphoglyceric acid (umol/ml) concentration changes of the red blood cells in the groups: control (n = 22), conservative (n = 63), revascularisation (n = 44), mean values, standard deviations

Table IV. Zmiany stężenia 2,3-difosfoglicerynianu (umol/ml) krwinek czerwonych w grupach: kontrolnej (n = 22), zachowawczej (n = 63), operowanych (n = 44); wartości średnie: odchylenie standardowe

	Initial values Wartości wyjściowe	After 6 weeks Po 6 tygodniach	After 12 weeks Po 12 tygodniach
Control group Grupa kontrolna	1.65 ± 0.51	—	—
Conservative group Grupa leczona zachowawczo	1.24 ± 0.26+	1.28 ± 0.31	1.87 ± 0.19*
Revascularisation group Grupa poddana operacji	0.98 ± 0.15+	1.71 ± 0.16*	1.01 ± 0.31

+ — statistically significant difference (p < 0.05) compared with the initial values of the controls (różnica znamienne p < 0,05 vs. wartości wyjściowe w grupie kontrolnej); * — statistically significant difference (p < 0.01) compared with the initial values within the same group (różnica znamienne (p < 0,01) vs. wartości wyjściowe w obrębie tej samej grupy)

Table V. GSH [mmol/ml] concentration changes of red blood cells in the groups: control (n = 220), conservative (n = 63), revascularisation (n = 44). Mean values, standard deviations**Table V.** Zmiana stężeń GSH [mmol/ml] krwinek czerwonych w grupach: kontrolnej (n = 220), zachowawczej (n = 63), operowanych (n = 44); wartości średnie: odchylenie standardowe

	Initial values Wartości wyjściowe	After 6 weeks Po 6 tygodniach	After 12 weeks Po 12 tygodniach
Control group Grupa kontrolna	2.26 ± 0.40	—	—
Conservative group Grupa leczona zachowawczo	1.13 ± 0.30+	1.41 ± 0.40*	1.67 ± 0.30*
Revascularisation group Grupa poddana operacji	0.98 ± 0.40+	1.02 ± 0.30	1.00 ± 0.20*

+ — statistically significant difference (p < 0.05) compared with the initial values of the controls (różnica znamienna p < 0,05 vs. wartości wyjściowe w grupie kontrolnej);

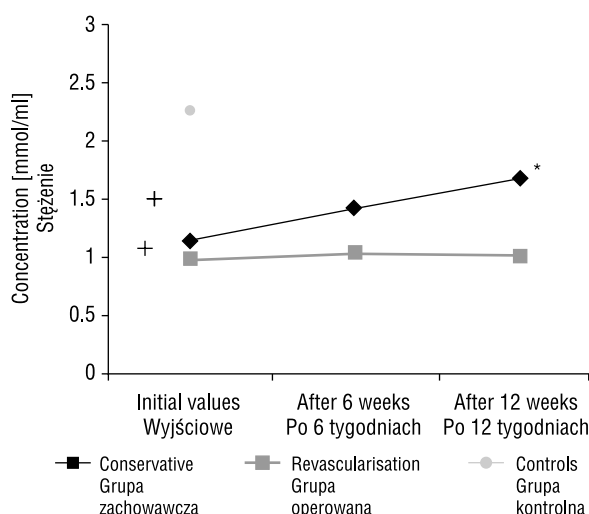
* — statistically significant difference (p < 0.01) compared with the initial values within the same group (różnica znamienna p < 0,01 vs. wartości wyjściowe w obrębie tej samej grupy)

subjected to surgical treatment, but in both groups it was notably lower than in the control group (p < 0.05). After 2 weeks of conservative treatment there was a significant increase in 2,3-DPG concentration (p < 0.05), while in the operative group, after a temporary increase in week 6, the 2,3-DPG concentration decreased, assuming in week 12 of observations a value close to the starting one.

The antioxidative potential of the erythrocytes was evaluated from the measured concentration of reduced glutathione (GSH) and the concentration of superoxide dismutase (SOD). The changes in GSH concentration are shown in Table V and in Figure III.

In both groups of patients who were receiving treatment, the starting values of GSH concentration were significantly lower when compared with the control group (p < 0.05), the lowest level being recorded among the patients admitted for surgical treatment. In the group subjected to conservative treatment, after just 6 weeks an increase in GSH concentration was recorded. Its level kept rising, and in week 12 was significantly higher when compared to the starting concentrations (p < 0.05). In the group subjected to surgical treatment, no increase of GSH concentration in erythrocytes was recorded. Also, in this case, after 12 weeks its concentration was statistically significantly lower (p < 0.001) when compared to the GSH concentration in the control group and in the group subjected to conservative treatment.

The changes in superoxide dismutase (SOD) are shown in Table VI and in Figure IV. In both groups, i.e. in the group with conservative treatment and in the group subjected to surgical treatment, the concentrations of SOD were significantly higher than the values observed in the control group (p < 0.05); the highest mean values of SOD were recorded in the group of patients admitted for surgical treatment.

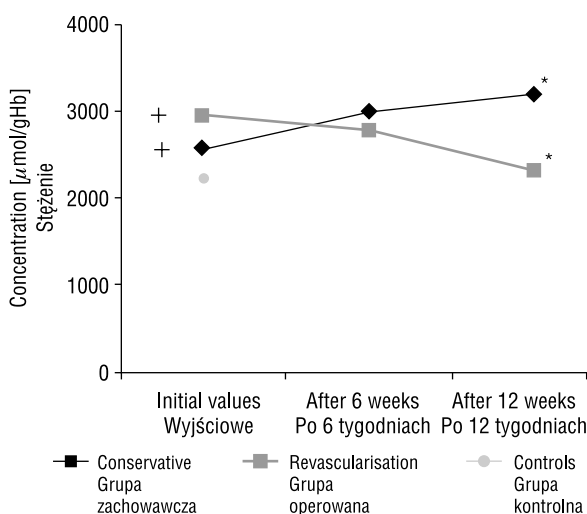
**Figure III.** GSH [mmol/ml] concentration changes of the red cells in the groups: control (n = 22), conservative (n = 63) and revascularisation (n = 44); mean values

Rycina III. GSH krwinek czerwonych w grupach: kontrolnej (n = 22), leczonej zachowawczo (n = 63) i poddanej operacji (n = 44); wartości średnie, + różnica statystycznie znamienna (p < 0,05) vs. wartości w grupie kontrolnej, * różnica statystycznie znamienna (p < 0,05) vs. wartości wyjściowe w tej samej grupie

we stężenia GSH były znamienne niższe niż w grupie kontrolnej (p < 0,05), przy czym najniższy jego poziom rejestrowano wśród chorych kwalifikowanych do zabiegu. W grupie leczonej zachowawczo już po 6 tygodniach stwierdzano wzrost stężenia GSH, a jego poziom nadal wzrastał i w 12. tygodniu był znamienne wyższy w porównaniu ze stężeniami wyjściowymi (p < 0,05). W grupie poddanej operacji nie wystąpił wzrost stężenia GSH w krwinkach czerwonych. Także po 12 tygodniach jego stężenie było statystycznie znamienne niższe (p < 0,001) w porównaniu ze stężeniami GSH odnotowanymi w grupach kontrolnej i leczonej zachowawczo.

Table VI. SOD [$\mu\text{mol/gHb}$] concentration changes of red cells in the groups: control ($n = 22$), conservative ($n = 63$), revascularisation ($n = 44$). Mean values, standard deviations**Tabela VI.** Aktywność SOD krwinek czerwonych w grupach: kontrolnej ($n = 22$), leczonej zachowawczo ($n = 63$) i poddanej operacji ($n = 44$); wartości średnie i odchylenia standardowe

	Initial values Wartości wyjściowe	After 6 weeks Po 6 tygodniach	After 12 weeks Po 12 tygodniach
Control group Grupa kontrolna	2245.8 \pm 302.0	—	—
Conservative group Grupa leczona zachowawczo	2607.3 \pm 405.0+	3024.1 \pm 501.0*	3232.6 \pm 408.0*
Revascularisation group Grupa poddana operacji	2971.0 \pm 395.0+	2803.0 \pm 460.0	2345.0 \pm 526.0*

+ — statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with the initial values of the controls (różnica znamionna $p < 0,05$ vs. wartości wyjściowe w grupie kontrolnej);* — statistically significant difference ($p < 0.01$) compared with the initial values within the same group (różnica znamionna $p < 0,01$ vs. wartości wyjściowe w obrębie tej samej grupy)**Figure IV.** SOD [$\mu\text{mol/gHb}$] concentration changes of the red cells in the groups: control ($n = 22$), conservative ($n = 63$) and revascularisation ($n = 44$); mean values**Rycina IV.** Aktywność SOD krwinek czerwonych w grupach: kontrolnej ($n = 22$), leczonej zachowawczo ($n = 63$) i poddanej operacji ($n = 44$); wartości średnie, + różnica statystycznie znamionna ($p < 0,05$) vs. wartości w grupie kontrolnej, * różnica statystycznie znamionna ($p < 0,05$) vs. wartości wyjściowe w tej samej grupie

The administered conservative treatment obviously stimulated SOD activity; its concentration increased, reaching a significantly high level ($p < 0.01$) after 12 weeks. In the case of patients subjected to surgical treatment, during post-operative period of observation, the concentration of SOD was recorded to undergo a significant decrease ($p < 0.05$) after 12 weeks.

Discussion

The examined population represented clinical groups with different degrees of atherosclerosis and ischemia of limbs advancement. According to commonly accepted standards, patients with medium distance of claudi-

Zmiany stężenia SOD przedstawiono w tabeli VI i na rycinie 4. Zarówno w grupie leczonej zachowawczo, jak i poddanej operacji wyjściowe stężenia SOD było znamionnie wyższe od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej ($p < 0,05$), zaś najwyższe średnie wartości SOD odnotowano w grupie chorych zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego.

Terapia zachowawcza wyraźnie stymulowała aktywność SOD — jej stężenie wzrastało, osiągając po 12 tygodniach wysoce znamionny wzrost ($p < 0,01$). W przypadku chorych operowanych w okresie obserwacji po operacyjnej po 12 tygodniach stężenia SOD znamionnie obniżało się ($p < 0,05$).

Dyskusja

Badana populacja obejmowała grupy kliniczne różniące się stopniem zaawansowania miażdżycy i niedokrwienia kończyn. Zgodnie z powszechnie akceptowanymi standardami chorych ze średnim dystansem chromania zakwalifikowano do leczenia zachowawczego, zaś pacjentów z krótkim dystansem chromania lub bólami spoczynkowymi — do zabiegu rewaskularyzacji.

Po zakończeniu leczenia w obu grupach obserwowano istotną poprawę kliniczną wyrażającą się wydłużeniem CAT oraz MWT.

Dostępne obecnie formy leczenia chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn mają charakter objawowy. W przypadku skutecznej rewaskularyzacji obserwowana poprawa wynika przede wszystkim ze zwiększenia dopływu krwi do kończyn oraz wzrostu wartości ciśnienia perfuzyjnego. Po leczeniu zachowawczym mechanizm uzyskiwanej poprawy nie jest jednoznacznie określony. Brak przekonujących dowodów, że terapia ta istotnie zwiększa przepływ w kończynach dolnych.

W mechanizmach obserwowanej poprawy obecnie coraz większą rolę przypisuje się normalizacji parametrów reologicznych krwi. Pentoksyfilina, którą

cation were admitted for conservative treatment, while patients with short distance of claudication or rest pains were admitted for revascularisation.

With the treatment completed, a significant clinical improvement was observed in both groups, manifested by prolongation of CAT and MWT.

The forms of treatment available at present, administered to patients suffering from atherosclerotic ischemia of limbs are of a symptomatic nature. In the case of successful revascularisation, the observed improvement is mainly due to increased blood flow access to the limbs and higher values of perfusion pressure. The mechanism of improvement obtained after medical treatment has not been defined in a consistent way. There are no sufficiently convincing proofs that the medical treatment can increase the blood circulation in lower limbs in a significant way.

In mechanisms of the observed improvement, an increasingly important role is at present ascribed to the normalisation of rheological blood parameters. Pentyxphiline, when administered to patients, reduces the viscosity of blood by lowering the fibrinogen concentration, improving the erythrocytes' and leucocytes' ability to change their shape, and reducing the leucocytes' and thrombocytes' susceptibility to aggregation. All these phenomena, when combined with reduced perfusion pressure, improve the capillary flow and contribute to the elongation of the distance of intermittent claudication, as observed in this group of patients.

The second element in the conducted therapy was walking exercises — often underestimated by both doctors and patients — although exercise seems to be one of the most effective strategies of therapy.

It is assumed that elongation of the distance of intermittent claudication due to walking exercises can be caused by: 1. adaptation and redistribution of the peripheral blood flow, 2. slowing down of progress of atherosclerosis, 3. changes in metabolism and morphology of skeleton muscles, 4. economisation of walking and reduced threshold of pain, 6. changes in blood rheology.

Our studies have proved that elements of clinical improvement, which were observed in patients subjected to conservative treatment, were also changes in physico-chemical properties and in the metabolism of erythrocytes, testifying their role in adaptation of patients with atherosclerotic ischemia of lower limbs to exercise.

The atherosclerosis of peripheral arteries and the related ischemia of lower limbs make erythrocytes lose their elasticity [9–11]. This phenomenon has also been observed in our patients, in whose case the starting deformability (elongation) of erythrocytes was signifi-

otrzymywali chorzy, zmniejsza lepkość krwi poprzez: obniżenie stężenia fibrynogenu, poprawę zdolności krwinek czerwonych i białych do zmiany kształtu oraz zmniejszeniu skłonności leukocytów i płytek krwi do agregacji.

Wszystkie te zjawiska, w sytuacji utrzymującego się obniżonego ciśnienia perfuzyjnego, wpływają na poprawę przepływu włosniczowego i przyczyniają się do wydłużenia dystansu chromania przestankowego, jaki obserwowano w tej grupie chorych.

Drugim elementem terapii były ćwiczenia marszowe często niedoceniane zarówno przez lekarzy, jak i chorych, mimo że trening fizyczny wydaje się być jedną z bardziej efektywnych metod leczenia.

Przyjmuje się, że wydłużenie dystansu chromania przestankowego pod wpływem treningu marszowego może się wiązać z: adaptacją i redystrybucją obwodowego przepływu krwi, zwolnieniem progresji miażdżycy, zmianami metabolizmu i morfologii mięśni szkieletowych, ekonomizacją chodzenia, obniżeniem progu bólu lub zmianami reologii krwi.

W niniejszych badaniach wykazano, że elementem poprawy klinicznej, jaka wystąpiła u chorych poddanych leczeniu zachowawczemu, były również zmiany własności fizyko-chemicznych i metabolizmu krwinek czerwonych, świadczące o ich udziale w przystosowaniu pacjentów z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych do wysiłku fizycznego.

Miażdżycę tętnic obwodowych i związane z nią niedokrwienie kończyn dolnych powodują usztywnienie krwinek czerwonych [9–11]. Zjawisko to obserwowano również u badanych chorych, u których wyjściowa odkształcalność (elongacja) krwinek czerwonych była znacznie niższa w porównaniu z grupą kontrolną, przy czym najniższe jej wartości dotyczyły grupy poddanej rewaskularyzacji, co z kolei wskazywało na zależność między stopniem usztywnienia krwinek a zaawansowaniem procesu miażdżycowego.

Odształcalność erytrocytów ma ogromne znaczenie w prawidłowym przepływie w obszarze włosniczowym. Wynika to z faktu, że muszą one niejednokrotnie przemieszczać się wewnątrz światła naczynia kapilarnego, którego średnica jest mniejsza od średnicy krwinki.

Ocenia się, że odkształcalność erytrocytów warunkują trzy czynniki: duża powierzchnia i stosunek powierzchnia/objętość wynikające z ich kształtu dwuwklęsłego dysku, elastyczność samej błony oraz lepkość wewnątrzkomórkowego roztworu hemoglobiny. Utrzymywanie kształtu dwuwklęsłego dysku wymaga stałego zużycia energii. Zaobserwowano, że usztywnienie krwinek wiąże się z obniżeniem ATP,

cantly lower than in the control group. The lowest values of this parameter were observed in the group subjected to revascularisation, which, in turn, testify to the existence of a relationship existing between the degree of blood cell stiffening and the advancement of the process of atherosclerosis.

The deformability of erythrocytes is of great importance for regular blood flow in the region of capillary vessels. This is because they often have to move in a capillary vessel whose internal diameter is smaller than that of a blood cell.

It is estimated that the deformability of erythrocytes depends on three factors, namely: 1. a large surface area and high value of the surface/volume ratio resulting from their biconcave disc shape, 2. elasticity of the membrane itself, 3. the viscosity of intracellular haemoglobin solution. Maintaining the biconcave disc shape requires permanent consumption of energy. It has been observed that the stiffening of blood cells is related to reduced ATP, accompanied by an increased content of intracellular Ca^{++} [10].

In the group of patients receiving a haemorheological drug and subjected to walking kinesitherapy, the erythrocytes underwent a significant increase in elasticity.

Three-months of walking exercises also stimulated the bone marrow and intensified the erythropoiesis as proved by an increase in the number of reticulocytes in peripheral blood.

Another phenomenon which could be observed and which was related to adaptation of the organism to exercise was the mobilisation of oxygen reserves, manifested in a shift of the haemoglobin dissociation curve to the right. A special role in this mechanism is played by 2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG) — a metabolite formed in erythrocytes in a lateral ramification of glycolysis, called the Rapaport-Luebering pathway. Introducing 2,3-DPG in-between the two beta chains of a haemoglobin particle shifts the curve of haemoglobin dissociation to the right, thus stimulating the action of giving oxygen back to the tissues and mobilising its reserves in blood under the conditions of disturbed function of the oxygen transport system in the organism [12–14]. The results of investigations concerning concentrations of 2,3-DPG in erythrocytes obtained in people and animals after various types of exercise are not consistent.

Yet, the majority of cases where no increase in 2,3-DPG in erythrocytes after exercise has been noted concerned young and healthy individuals, often record-breaking athletes. It seems that in the case of people living in lowland areas, the mobilisation of oxy-

któremu towarzyszy wzrost wewnątrzkomórkowego Ca^{++} [10].

W grupie chorych otrzymujących lek hemoreologiczny i poddanych kinezyterapii marszowej dochodziło do znamienego wzrostu elastyczności krwinek czerwonych.

Trzymiesięczny trening marszowy stymulował również szpik i nasilał erytropoezę, o czym świadczył wzrost liczby retikulocytów krwi obwodowej.

Innym zjawiskiem, które obserwowano związanym z adaptacją organizmu do wysiłku fizycznego było uruchomienie rezerw tlenowych poprzez przesunięcie na prawo krzywej dysocjacji hemoglobiny. Szczególną rolę w tym mechanizmie odgrywa 2,3-DPG — metabolit powstający w erytrocytach w bocznym odgałęzieniu glikolizy, zwanym szlakiem Rapaporta-Lueberinga.

Wprowadzenie 2,3-DPG między dwa łańcuchy beta cząsteczki hemoglobiny przesuwają krzywą dysocjacji hemoglobiny w prawo, umożliwiając oddanie tlenu tkankom oraz uruchamiając rezerwy tlenowe krwi w stanach zaburzeń czynności układu transportowego tlenu w organizmie [12–14]. Wyniki badań dotyczące stężeń 2,3-DPG w erytrocytach uzyskane u ludzi i u zwierząt po różnych rodzajach wysiłku fizycznego nie są jednoznaczne.

Większość obserwacji, w których nie odnotowano wzrostu 2,3-DPG w erytrocytach po wysiłku fizycznym, dotyczyła jednak młodych, zdrowych osób, często wyczynowych sportowców. Wydaje się, że w nizinnych warunkach bytowania mobilizacja w czasie pracy fizycznej rezerw tlenowych hemoglobiny za pośrednictwem zwiększenia produkcji 2,3-DPG u tych ludzi ma niewielkie znaczenie [12, 13].

Natomiast uruchomienie cyklu Rapaporta-Lueberinga może odgrywać istotną rolę w czasie wysiłku fizycznego wykonywanego na dużych wysokościach lub u osób, u których występuje niedokrwienie tkanek (np. kończyn dolnych), a ich układ oddechowo-kръżeniowy jest niedostatecznie przystosowany do wysiłku fizycznego.

Chorzy z przewlekłym miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych przez wiele lat narażeni są na powtarzające się epizody niedokrwienia-reperfuzji.

Wykazano, że występujące zwłaszcza w fazie reperfuzji bardzo szkodliwe zmiany metaboliczne wiążą się ze stanem stresu oksydacyjnego wywołanego nadprodukcją reaktywnych form tlenu [15, 16]. Zmiany te mają charakter systemowy, mogą prowadzić do uszkodzenia śródbłonna naczyniowego i nasilenia rozwoju miażdżycy, dlatego tak ważna jest rola wewnątrzustrojowych antyutleniaczy — zmiataaczy wolnych rodników

gen reserves in haemoglobin during physical work is of no greater importance [12, 13]. On the other hand, the start of the Rapaport-Luebering cycle can play an important role during physical effort made at high altitudes, or in persons who suffer from ischemia of tissues, e.g. in lower limbs, and whose respiratory and circulatory systems have not been adapted well enough to the exercise.

Patients with chronic atherosclerotic ischemia of lower limbs are, for many years, exposed to the recurrent ischemia — reperfusion episodes. It has been proved that the very harmful metabolic changes, which occur especially at the stage of reperfusion, are related to the state of oxidative stress caused by overproduction of the reactive forms of oxygen [15, 16]. The changes are of a systemic nature and can result in the damage of vascular endothelium with intensification of progress in atherosclerosis. Hence, the role played by intrasystemic antioxidants — the “sweepers” of free oxygen radicals — is very important, a measure of which is the antioxidative potential of organisms [17, 18].

Numerous studies have tried to prove the relationship that is said to exist between exercise and the increased antioxidative potential of organisms [19, 20]. The majority of researchers are of the opinion that there exists an additional correlation between the activity of antioxidative enzymes and the oxygen capacity of an organism [18–21].

Important elements in an organism's defence against oxidative stress are the red blood cells. Their antioxidative potential depends on the concentration of reduced glutathione and on the activity of superoxide dismutase. The function played by glutathione (composed of three γ -glutamyl-cysteinyl-glycine amino acid residues) depends to some degree on the structure of this compound and on the presence of an $-SH$ group belonging to the cysteinyl residue. It confers its reactivity to a particle of glutathione and decides about the role played by this compound in a number of important reactions. The thiol group of reduced glutathione (GSH) may undergo oxidation, and usually this oxidation leads to the formation of glutathione disulphide (GSSG). The oxidation of glutathione may take place in a non-enzyme mode, but it is considerably accelerated by glutathione peroxidase, especially when the oxidating agent is hydrogen peroxide or organic peroxides [20, 22].

The second factor ensuring antioxidative properties of red blood cells is the presence in these cells of an enzyme of superoxide dismutase, which, together with catalysis and glutathione peroxidase, are responsible for the accelerated decomposition of superoxide anion radicals and hydrogen peroxide.

tlenowych, wyznaczających potencjał antyoksydacyjny ustroju [17, 18].

W wielu pracach wykazano związek między trenin-
giem fizycznym a wzrostem potencjału antyoksydacyj-
nego organizmu [19, 20].

Większość badaczy uważa, że istnieje dodatnia ko-
relacja między aktywnością enzymów antyutleniających
a pojemnością tlenową organizmu [18–21].

Istotny element obrony ustroju przed stresem oksy-
dacyjnym stanowią krwinki czerwone. O ich potencja-
le antyoksydacyjnym decyduje stężenie zredukowane-
go glutationu oraz aktywność dysmutazy ponadtlen-
kowej. Funkcja, jaką pełni glutation (złożony z trzech
reszt aminokwasowych γ -glutamyl-cysteinyl-glicyna),
wiąże się w jakimś stopniu ze strukturą tego związku
i obecnością należącej do reszty cysteinowej grupy
— $-SH$. Nadaje ona cząsteczce glutationu reaktyw-
ność i decyduje o udziale tego związku w wielu waż-
nych reakcjach. Grupa tiolowa zredukowanego gluta-
tionu (GSH) może ulec utlenieniu, przy czym zazwy-
czaj utlenienie to prowadzi do powstania disulfidu gluta-
tionu (GSSG). Do utleniania glutationu może docho-
dzić na drodze nieenzymatycznej, lecz znacznie przy-
spiesza je peroksydaza glutationowa, zwłaszcza jeśli
czynnikiem utleniającym jest nadtlenek wodoru lub
nadtlenki organiczne [20, 22].

Drugim czynnikiem gwarantującym własności anty-
oksydacyjne krwinek czerwonych jest obecność w nich
enzymu dysmutazy ponadtlenkowej, który wraz z katala-
zą i peroksydazą glutationową katalizują rozkład anio-
norodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru.

W niniejszych badaniach wykazano, że u chorych
z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych wys-
tępuje stan przewlekłego stresu oksydacyjnego, na co
wskazywały znamienne niższe stężenia GSH oraz
podwyższona aktywność dysmutazy ponadtlenkowej
w porównaniu z odnotowaną u osób z grupy kontrolnej.
Leczenie zachowawcze po 12 tygodniach prowadziło
do odbudowy potencjału antyoksydacyjnego, na co
wskazywały znamienne wzrosty stężenia GSH i dysmu-
tazy ponadtlenkowej.

W grupie z zaawansowaną miażdżycą i niedo-
krwieniem kończyn, mimo skutecznej rewaskulary-
zacji i poprawie klinicznej, nadal utrzymywały się nie-
korzystne zmiany, takie jak sztywność krwinek czer-
wonych oraz niski potencjał antyoksydacyjny. Skutecz-
na rewaskularyzacja u osób z krytycznym niedokrwie-
niem kończyn dolnych w znacznym stopniu ograni-
cza metabolicznie szkodliwy efekt zespołu niedo-
krwienie-reperfuzja. Umożliwia to w okresie poope-
racyjnym wdrożenie u tych chorych programu ćwiczeń
marszowych, które wraz z lekami hemoreologicznymi

Our investigations have revealed a state of chronic oxidative stress in patients suffering from atherosclerotic ischemia of lower limbs, as testified by the significantly lower concentration of GSH in comparison with the control group, and increased activity of superoxide dismutation. After 12 weeks, the prophylactic treatment resulted in recovery of the antioxidative potential as indicated by a significant increase in GSH concentration and superoxide dismutation.

In the group with advanced atherosclerosis and ischemia of limbs, in spite of successful revascularisation and clinical improvement, some unfavourable changes, such as stiffening of erythrocytes and low antioxidative potential, still persisted.

In patients with critical ischemia of lower limbs, the successful revascularisation reduces the metabolically harmful effect of ischemia-reperfusion to a considerable extent. Due to this, during the post-operative period, it became possible to include these patients in a programme of walking exercises, which, combined with a haemorheological drug, should, in our opinion, increase red cell elasticity, antioxidant potential and optimize flow through the microcirculation.

Conclusions

In patients with atherosclerotic ischemia of lower limbs and medium distance of intermittent claudication amounting to 400 metres, after conservative treatment including walking exercises, the system of red blood cells takes an active part in the adaptation of the organism to exercise. This effect has not been observed in patients with advanced atherosclerosis and ischemia of limbs after successfully conducted revascularisation.

References

1. Grace P (1994) Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 81: 637–642.
2. Carden D, Smith J (1999) Neutrophil mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle, role of granulocyte adherence. *Circ Res*, 66: 1436–1441.
3. Drożdż W (2000) Aktywacja granulocytów obojętnożłonnych i stres oksydacyjny u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych. *Pol Przegl Chir*, 72, 5: 403–417.
4. Ernst E, Matar A (1987) Intermittent claudication, exercise and blood rheology. *Circulation*, 76: 1110–1115.
5. Mokken F, Kedaria M, Henny C (1992) The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter. *Ann Hematol*, 64: 113–119.
6. Rose Z, Liebowitz J (1970) Direct determination of 2,3-diphosphoglycerate. *Ann Biochem*, 177: 35.
7. Beutler E (1981) Red cell metabolism. A manual of biochemical methods; 3rd ed. Grune Stratton New York, San Francisco, London.

powinny — zdaniem autorów — doprowadzać do wzrostu elastyczności krwinek czerwonych i odbudowy potencjału antyoksydacyjnego, co z kolei stworzy optymalne warunki przepływu, szczególnie w obszarze mikrokrążenia.

Wnioski

U chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych i średnim dystansem chromania przestankowego wynoszącym 400 m, po leczeniu zachowawczym (obejmującym ćwiczenia marszowe), układ czerwono krwinkowy bierze czynny udział w adaptacji ustroju do wysiłku fizycznego. Efektu tego nie obserwowano u chorych z zaawansowaną miażdżycą i niedokrwieniem kończyn po przeprowadzonej rewaskularyzacji.

8. Bartosz G (1993) Metabolizm glutationu. *Postępy Biochemii*, 39: 52.
9. Farconi G, Guerrini M, Di Perri F (1984) Rheological approach to the treatment of cardiovascular disease. In: Hegych RJ (ed). *Atherosclerosis reviews*, vol. 12. Raven Press, New York.
10. La Celle P, Smith B (1981) Biochemical factors influencing erythrocyte deformability and capillary entrance phenomena. *Scand J Clin Lab Invest*, 41 (suppl 156): 145.
11. Langenfeld J, Livingston H, Machiedo G (1991) Red cells deformability is an early indicator of infection. *Surgery*, 110: 398–402.
12. Bosworth J, Kuta L, Lisy Z, Kostiak D (1983) 2-3 diphosphoglycerate during exercise. *Eur J Appl Physiol*, 43: 1980–1983.
13. Spodaryk K, Berger L, Hanke S (1990) Influences of physical training on the functional changes of young and old red blood cells. *Mechanism of Ageing and Development*, 55: 199, 202.
14. Regensteiner J, Steiner J, Hiatt W (1996) Exercise training improves functional states in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*, 23: 104–109.
15. Singh N, Dhalla A, Senevirante C (1995) Oxidative stress and heart failure. *Moll Cell Biochem*, 147: 77–79.
16. Vedder W, Fonty B, Winn R, Horlan J (1989) Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *Surgery*, 100: 509–517.
17. Bray T, Taylor C (1993) Tissue glutathione nutrition, and oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol*, 71: 746–751.
18. Sies H (1985) In: Sies H (ed) *Oxidative stress*. Academic Press, New York, 1–8, 14.
19. Mera P, Maynar A, Gutterreze J (1991) Erythrocyte free radical scavenger enzymes, in bicycle professional races. *Adaptation to running*. *Int J Sports Med*, 12: 563–566.
20. Evelo C, Palmen V, Artur J (1992) Changes in blood glutathione concentrations and in erythrocyte glutathione reductase activity after running. *Eur J Appl Physiol*, 64: 354–358.
21. Drożdż W, Wysocki A, Panek J (1999) Red cells antioxidant state during treadmill exercise program in claudicants. *J Eur Surg Res*, 31 (suppl): 138.
22. Gohil K, Vignie C, Stanley W, Brooks C (1998) Blood glutathione oxidants during human exercise. *J Appl Physiol*, 64: 115–118.